Animal Health and Infectious Diseases
Volume 1, Issue 1
Journal homepage: https://jahid.lu.ac.ir/

Genomic Detection of *Coxiella burnetii* in Cow's Milk Samples of Lorestan Province based on *IS1111* transposon Gene

Maryam Najafi Asl *[1], Shahriyar Mehrabi [2]

1. Ph.D Student Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2. DVSc Graduate of Larg Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahavz, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: The present study was conducted with the aim of molecular search for *Coxeillaburnetii* in raw milk samples collected from cows of Lorestan province.

Materials and Methods: This is a cross-sectional and descriptive studyin which 200 milk sampleswere randomly collected from the herds of traditional cattle farms belonging to two cities (Khorramabad and Poldakhtar) of Lorestan province. Collecting milk samples and recording the age of animals was done in the winter of 1400. The process of DNA extraction from all milk samples was also done. Then, Nested-PCR reaction was used to detect *C. burnetii* based on the *IS1111* transposon gene. Also, SPSS software and Chi-square method were used for statistical analysis.

Results:. The results obtained from amplification of the *IS1111* transposon geneshowed that 5% (95% CI: 0.7-55%) of the milk samples were positive for *C. burnetii* microbial load. It was found that there is a significant relationship between the age of the cow and the excretion of *C. burnetii* through the cow milk in Lorestan province ($p<0.05$).

Conclusion:. Based on the findings of this study, it can be concluded that cow's milk can be considered as one of the important sources in the transmission of *C. burnetii* bacteria to the next hosts. Therefore, because of the long shelf life of *C. burnetii* due to the presence of the pseudospore form, the risk of transmission of *C. burnetii* through raw milk and unpasteurized dairy products cannot be ignored. Therefore, cow's milk should be considered as an important factor in the epidemiology of Q fever and public health in the central region of Lorestan province.

Keywords: Milk, Transposon gene, Nested-PCR, *Coxiella burnetii*.

Received: 27.10.2023 **Accepted: 08.02.2024** **Final Edit: 08.02.2024** **Published Online: 08/02/2024**

Corresponding Information: Maryam NajafiAsl, Ph.D Student Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Email: maryamnajafiasl.mss@gmail.com

Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.

بهداشت و بیماری های عفونی دام
شماره ۱، دوره ۱
صفحه مجله: https://jahid.lu.ac.ir/

جستجوی ژنومی *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر گاو استان لرستان بر اساس ژن ترانسپوزونی *IS1111*

مریم نجفی اصل[۱*]، شهریار مهرابی[۲]

۱. دانشجو دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. دانشجو دکتری تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: پژوهش حاضر با هدف جستجوی مولکولی *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده از گاوها در استان لرستان انجام شده است.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی و توصیفی انجام شده است. تعداد کلی ۲۰۰ نمونه شیر به طور تصادفی از گله‌های گاوداری های سنتی متعلق به دو شهر (خرم‌آباد و پلدختر) استان لرستان، جمع‌آوری شد. نمونه‌های شیر در فصل زمستان سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد، همچنین سن حیوانات ثبت شد. از همهٔ نمونه‌های شیر DNA استخراج شد. سپس برای تشخیص *کوکسیلا بورنتی* بر اساس ژن ترانسپوزونی *IS1111* از واکنش Nested-PCR استفاده شد. همچنین جهت آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS و روش کای دو مربع استفاده گردید

یافته ها: نتایج به دست آمده از تکثیر ترانسپوزونی *IS1111* نشان داد که ۵ درصد (۹۵ درصد CI: ۰/۷–۵۵ درصد) از نمونه‌های شیر مورد بررسی، از نظر بار میکروبی *کوکسیلا بورنتی* مثبت بودند. مشخص شد که بین سن گاو با دفع *کوکسیلا بورنتی* از طریق شیر گاوهای استان لرستان ارتباط معنی داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$)

نتیجه گیری: بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان به این نتیجه رسید که شیر گاو می‌تواند به عنوان یکی از منابع مهم در انتقال باکتری *کوکسیلا بورنتی* به میزبان‌های بعدی، در نظر گرفته شود. بنابراین، به دلیل ماندگاری بالای *کوکسیلا بورنتی* به علت وجود فرم شبه اسپور، خطر انتقال *کوکسیلا بورنتی* از طریق شیر خام و محصولات لبنی پاستوریزه نشده، نمی‌توان از آن چشم پوشی کرد. بنابراین، شیر گاو باید به عنوان عامل مهمی در اپیدمیولوژی تب کیو و سلامت عمومی در منطقهٔ مرکزی استان لرستان در نظر گرفته شود.

کلیدواژه ها: شیر، ژن ترانسپوزونی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای، *کوکسیلا بورنتی*

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۵ **پذیرش:۱۴۰۲/۱۱/۱۹** **ویرایش نهایی: ۱۴۰۲/۱۱/۱۹** **انتشار آنلاین:۱۴۰۲/۱۱/۱۹**

۱. **اطلاعات نویسنده مسئول:** مریم نجفی اصل، دانشجو دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Email: maryamnajafiasl.mss@gmail.com

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد مطالب را فقط در استفاده غیرتجاری با استناد مناسب می دهد.

مقدمه

مهم‌ترین قسمت اصلی در سود اقتصادی مزارع پرورش گاوهای شیری منوط به عملکرد تولید مثل بهینهٔ گله، به خصوص گوساله زایی است و هر علت و عاملی که باعث اُفت آن شود، موجب کاهش سود و خسارات اقتصادی می‌شود. سقط جنین مهم‌ترین عوامل اصلی کاهش گوساله زایی و زیان اقتصادی در گله‌های گاو شیری است. عوامل متعددی چه عفونی و غیر عفونی می‌توانند در ایجاد سقط جنین نقش داشته باشند. یکی از مهم ترین عوامل سقط جنین های عفونی در دام های اهلی باکتری است (۱). تب کیو، اولین بار در سال ۱۹۳۷ توصیف شد، که بیماری مشترکی بین انسان و دام در سراسر جهان است. به دلیل اینکه علائم و تشخیص این بیماری، اغلب غیراختصاصی و چالش برانگیزند، عامل این بیماری میکروارگانیسمی به نام *کوکسیلا بورنتی است* که یک باکتری داخل سلولی است و عفونت در انسان بیشتر از طریق استنشاق باکتری های موجود در هوا رخ می‌دهد. که شناسایی و تشخیص آن وقت گیر بوده و اغلب قابل شناسایی نیست. مخازن اولیهٔ *کوکسیلا بورنتی* نشخوارکنندگان (گاو، گوسفند و بز) هستند. با وجود این، عفونت در گونه‌های متعددی از مهره داران، از جمله حیوانات حیات وحش، پستانداران دریایی، پستانداران اهلی، پرندگان و خزندگان تأیید شده است. در مطالعهٔ رائوت و همکاران در سال ۲۰۰۰، تعداد ۴۷۷ مورد تب کیو در کشور فرانسه گزارش داده‌اند که در اثر مصرف پنیر غیر پاستوریزه بوده است. در سال ۲۰۰۸، ۱۶۷ مورد بیماری تب کیو گزارش شده است، که در مقایسه با سال ۲۰۰۰، ۱۷ مورد بیماری تب کیو گزارش شده است. بزرگ ترین اپیدمی تب کیو بین سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۷ بوده که ۴۰۰۰ مورد درگیری انسانی رخ داده است. نتایج پژوهشی در سال ۲۰۱۱، ۵ مورد ابتلا به تب در اثر مصرف شیر خام در ایالت میشگان آمریکا را نشان داده است (۲). سابقهٔ دقیق ارتباط با دام، می‌تواند به مسئولان بهداشتی در تشخیص و شناسایی بیماری تب کیو کمک کند. در صورت تماس مستقیم نداشتن با حیوانات، می بایست به انتقال *کوکسیلا بورنتی* از طریق هوا و ابتلا به تب کیو، از طریق تنفسی شک کرد. بنابراین، برای درک بهتر اپیدمیولوژی *کوکسیلا بورنتی* در منطقهٔ لرستان، به ویژه مقایسهٔ سویه‌های موجود در گاو و محصولات لبنی با سایر موارد انسانی و ارزیابی خطر شیر خام گاو برای مصرف کنندگان بررسی وجود *کوکسیلا بورنتی* ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به مطالب گفته شده، در سراسر جهان اطلاعات کافی از تب کیو وجود ندارد (۲). زیرا این بیماری به راحتی در سطح جمعیت دامی قابل‌کنترل نیست و همچنین در انسان ایجاد عفونت‌های بدون علائم بالینی می‌کند و از آنجا که تب کیو بیماری مشترکی بین انسان و حیوان است که می‌تواند به صورت اپیدمی ظهور پیدا کند و علاوه بر این با توجه به موقعیت و روش سنتی زندگی در بیشتر استان‌های ایران و تولید و مصرف انواع محصولات لبنی سنتی مانند پنیر لیقوان در تبریز، چال (دوغ حاصل از شیر شتر) در استان گلستان، کرهٔ مسکه در خراسان، پنیر کوزه در آذربایجان غربی و کردستان و انواع دیگر محصولات لبنی سنتی دیگر که در بیشتر مناطق مختلف کشور تولید و مصرف می‌شود (که در تهیهٔ این محصولات معمولاً حرارت اعمال نمی‌شود یا از حرارت‌های خیلی پایین استفاده می‌شود) (۱)، این محصولات می‌توانند به عنوان یکی از عوامل اصلی انتقال این باکتری به انسان باشند و تهدیدی برای امنیت غذایی جامعه باشد. این مطالعه با هدف اصلی تشخیص مولکولی *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر گاو با روش Nested-PCR در مناطق مختلف استان لرستان انجام شده است.

روش کار

جمع آوری نمونه‌های شیر

این بررسی که به صورت توصیفی مقطعی در زمستان سال ۱۴۰۰ انجام شد. تعداد ۲۰۰ نمونه شیر گاو از شهرستان‌های (خرم‌آباد و پلدختر) استان لرستان جمع‌آوری شد. برای گرفتن نمونهٔ شیر ابتدا سرپستانک‌های هر دام با الکل ۷۰ درصد ضد غفونی شد و سپس چند قطره از شیر پستان دور ریخته شد و از شیر میانی مقدار ۱۵ میلی لیتر نمونه به داخل لوله‌های فالکن استریل ریخته شد و در مرحلهٔ بعدی نمونه‌ها درکنار یخ داخل جعبهٔ مخصوص نمونه به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکدهٔ دام‌پزشکی انتقال داده شدند. تعداد نمونه‌های جمع‌آوری بر اساس موقعیت جغرافیایی و گروه سنی در جدول ۱ آورده شده است.

شهرستان	تعداد نمونهٔ گرفته‌شده	تعداد نمونه‌ها براساس سن		
		کمتر ۲ سال	۲ تا ۴ سال	بالاتر از ۴ سال
خرم‌آباد	۱۰۰	۳۵	۳۲	۳۳
پلدختر	۱۰۰	۳۰	۳۴	۳۶
جمع کل نتایج	۲۰۰	۶۵	۶۶	۶۹

جدول ۱ : تعداد نمونه‌های شیر جمع آوری شده بر اساس منطقهٔ جغرافیایی، گروه سنی

استخراج DNA از شیر

به منظور استخراج DNA از شیر از کیت استخراج DNA (Gene All cell SV mini 250p) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از رسوب نمونه به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد، سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به هر نمونه اضافه گردید. در مرحلهٔ بعد از بافر لیز کننده (BL) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب حاوی نمونه اضافه شد و میکروتیوب ورتکس شد. بعد این مراحل میکروتیوب‌ها به بن ماری ۵۶ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انتقال داده شدند. پس از این مرحله یک سانتریفوژ کوتاه انجام شد و در مرحلهٔ بعد ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق به نمونه اضافه گردید. در این مرحله تمام نمونه به لوله‌های فیلتردار (SV) انتقال داده شد و به مدت یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ شد، و مایع زیری جمع آوری شده در لولهٔ زیر ستون تخلیه شد. بعد از این مرحله ۶۰۰ میکرولیتر بافر شست و شو دهنده (BW) اضافه شد و به مدت یک دقیقه در ۸۰۰ دور سانتریفوژ انجام شد. در مراحل بعد بافر شست و شو دهنده مرحلهٔ دوم به نام (TW) اضافه شد و به مدت یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید، و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر بافر جدا کننده یا احیا کننده (AE) اضافه شد و به مدت یک دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و در نهایت DNA به دست آمده تا زمان انجام مراحل PCR در دمای ۲۰- سانتی‌گراد فریز شود.

بررسی DNA استخراج شده

جهت اطمینان از روش استخراج و ارزیابی میزان غلظت DNA به صورت تصادفی، جذب نوری تعداد ۱۰ نمونه از نمونه‌های استخراج شده به وسیلهٔ نانودارپ در طول موج ۲۶۰ قرائت شد و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ (DNA/protein) نیز تعیین شد.

پی‌سی‌آر معمولی و تاج دون پی‌سی‌آر

برای انجام مراحل در مرحلهٔ اول از روش پریسی و همکاران، سال (۲۰۰۶) استفاده شد (۳). به منظور PCR مرحلهٔ اول، غلظت بهینهٔ مواد به کار رفته در واکنش، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت زیر استفاده شد. مقدار پنج میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم DNA الگو در هر واکنش)، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ میکرو مولار (Trans1, Trans2) ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس به صورت آماده سپس به هر نمونه ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. ابتدا در مرحله Trans-PCR به منظور بهینه سازی، کاهش آلودگی‌ها، حذف ممانعت کننده‌ها و همچنین افزایش اختصاصیت و حساسیت واکنش از تاج دون پی‌سی‌آر استفاده شد، برنامهٔ دمایی روش تاج دون در جدول ۳ آورده شده است. کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه سویهٔ استاندارد *کوکسیلا بورنتی*، *Coxiella burnetii* standard Nine Mile strain (RSA 493) بود که از طریق دانشگاه لرستان، دانشکدهٔ دامپزشکی تهیه شده بود و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۴).

غلظت مورد در هر واکنش	محصول PCR (جفت باز)	سکانس ۵′------۳′	نام پرایمر	پروتکل
۲۵ میکرومولار	۶۸۷	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	Trans 1	Trans-PCR
		CCCAACAACACCTCCTTATTC	Trans 2	
	۲۰۳	GAGCGAACCATTGGTATCG	261F	nested-PCR
		CTTTAACAGCGCTTGAACGT	463R	

جدول ۲ : پرایمر های مورد استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای جهت شناسایی ژن IS1111 (۳)

تعداد چرخه	زمان	دما	مرحله	
۱	۲ دقیقه	۹۵	واسرشت‌سازی اولیه	
۵	۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشت‌سازی	Touchdown PCR
	۱ دقیقه	۶۱–۶۶	چسبیدن پرایمر	
	۱ دقیقه	۷۲	توسعه	
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشت سازی	Normal PCR
	۳۰ ثانیه	۶۱	چسبیدن پرایمر	
	۱ دقیقه	۷۲	توسعه	
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	توسعهٔ نهایی	

جدول ۳ : برنامه و سیکل‌های دمایی PCR جهت شناسایی ژن IS1111 (۳)

مرحلهٔ Nested-PCR

جهت انجام روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای از روش پریسی و همکاران استفاده شد. برای PCR مرحلهٔ دوم (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای) از پرایمرهای (261F و 463R) استفاده شد. در این مرحله همهٔ شرایط، از قبیل مخلوط واکنش‌گرها به استثنای برنامهٔ دمایی مطابق مرحلهٔ اول اجرا شد، با این تفاوت که

DNA الگو در این مرحله ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR مرحلهٔ اول است که به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق و به مخلوط واکنش اضافه شد. لازم به ذکر است که در هر سری از آزمایش، کنترل مثبت و منفی استفاده شد. در مرحلهٔ Nested-PCR محصول مرحلهٔ اول به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. (یعنی ۱ میکرولیتر محصول PCR در ۹۹ میکرولیتر آب مقطر حل شد). همهٔ شرایط این مرحله از قبیل مخلوط واکنش‌گرهای PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق جدول ۴ اجرا شد.

تعداد چرخه‌ها	زمان	دما (°C)	مرحله
۱	۳ دقیقه	۹۴	واسرشت سازی اولیه
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشت سازی
	۴۵ ثانیه	۵۴	چسبیدن پرایمر
	۱ دقیقه	۷۲	توسعه
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	توسعهٔ نهایی

جدول ۴: برنامه و سیکل‌های دمایی واکنش پلیمراز آشیانه‌ای جهت شناسایی ژن IS1111 (۳)

آنالیز آماری داده‌ها

جهت آنالیز آماری از برنامهٔ آماری SPSS نسخه ۱۹ (IBM, USA) و روش کای دو مربع استفاده شد. درصد اطمینان ۹۵ درصد و حداقل ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

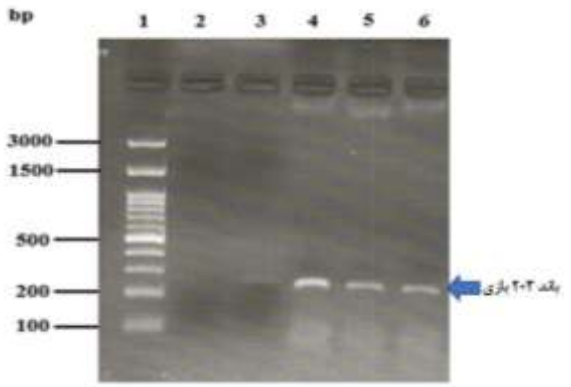
یافته‌ها

نتایج آزمایش Touchdown Nested-PCR در شیر گاو

در این مطالعه از مجموع ۲۰۰ نمونه شیر ۱۱ نمونه (۵/۵ درصد) از نظر وجود کوکسیلا بورنتی مثبت بود (جدول ۵) نتایج بر اساس مناطق مورد مطالعه در استان لرستان را نشان می‌دهد

شهرستان	خرم‌آباد	پلدختر	جمع کل نتایج
تعداد نمونه	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۰
تعداد مثبت	۳ (۳ درصد)	۸ (۸ درصد)	۵/۵ درصد

جدول ۵: نتایج مطالعه بر اساس منطقه مورد مطالعه



شکل ۱: آزمایش Nested-PCR شیر گاو
چاهک ۱ مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، چاهک‌های ۵ و ٦ نمونه‌های مثبت، چاهک ۲، ۳ کنترل منفی، چاهک ٤ کنترل مثبت
(C. burnetii standard Nine Mile strain RSA 493)

نتایج آزمایش Touchdown Nested-PCR در شیر گاو (براساس منطقهٔ جغرافیایی)

بیشترین میزان آلودگی نمونه‌های شیرگرفته شده در منطقه مرکزی استان لرستان (پلدختر) مشاهده شد. یعنی از ۱۰۰ نمونه شیر اخذ شده، تعداد ۸ نمونه (۸ درصد) ازنظر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* مثبت بودند(جدول ۱). بررسی نتایج این مطالعه نشان داد که بین فراوانی آلودگی شیر و نوع منطقه اختلاف معنی‌داری در استان لرستان وجود دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که منطقهٔ جغرافیایی بر میزان عفونت ناشی *کوکسیلا بورنتی* و دفع از طریق شیر در گاو استان لرستان تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

نتایج آزمایش Touchdown Nested-PCR در شیر گاو (براساس سن)

در این مطالعه سه گروه سنی به ترتیب (زیر ۲ سال، ۲ تا ۴ سال و بالای ۴ سال) در نظر گرفته شد. از مجموع ۶۵ نمونه شیر در گروه سنی زیر دو سال و از مجموع ۶۶ نمونه گروه سنی ۲ تا ۴ سال هیچ‌کدام از نمونه‌ها آلوده به کوکسیلا بورنتی نبودند. از تعداد ۶۹ نمونه در گروه سنی بالای چهار سال به بالا، ۱۱ نمونه (۱۶ درصد) آلوده به *کوکسیلا بورنتی* بودند. بررسی نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بین آلودگی و حضور *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو وجود دارد.

بحث

تب کیو به عنوان بیماری مشترکی انسان و حیوان نوپدید و باز پدید در بسیاری از کشورها، از جمله ایران مطرح شده است. اگرچه این بیماری جنبهٔ شغلی داشته و معمولاً در افرادی که تماس با حیوانات و

محصولات آن‌ها هستند، فراوانی بیشتری دارد. اما با توجه به مقاومت بالای عامل بیماری‌زا در محیط و قابلیت انتقال آن ازطریق هوا، امکان آلودگی سایر افراد جمعیت نیز وجود داشته و امروزه به‌عنوان یکی از مخاطرات مهم سلامتی انسان مطرح است(۵, ۶).

تب کیو تأثیر عمده‌ای در سلامت عمومی در هنگام شیوع دارد. شیوع آن پی‌درپی و در سرتاسر جهان گزارش می‌شود. شیوع آن معمولاً از لحاظ جغرافیایی بومی شده و محدود به قسمت خاصی است. گوسفند، بز، گاو و گاومیش به‌عنوان منبع اصلی این باکتری در بیشتر شیوع‌های گزارش شده مطرح‌اند. بنابراین، شناسایی منبع و تأیید ارتباط با بیماری انسان ترجیحاً با ژنوتیپ گونه‌های کوکسیلا بورنتی انجام می‌شود.

با توجه به مطالعات سرولوژی و مولکولی، بروز تب کیو در حیوانات در ایران به‌خوبی اثبات شده است. اهمیت نشخوارکنندگان در این بیماری مشخص است و دفع کوکسیلابورنتی ازطریق شیر خطر عفونت مرتبط با مصرف شیر خام گاو را برجسته کرده است. با این‌حال، تاکنون اطلاعات کمی برای ارزیابی خطر عفونت مرتبط با مصرف پنیر در دسترس است. با توجه به مقاومت بالای کوکسیلابورنتی در برابر حرارت پایین و بالا و همچنین روند تولید و فرآوری پنیرها، پذیرفتنی است که مصرف پنیر تهیه‌شده از شیر خام یا شیر غیر پاستوریزه دلیل ایجاد عفونت در انسان باشد (۷, ۸).

براساس مطالعات انجام‌شده در مناطق مختلف جغرافیایی ایران شیوع ۰ تا ۴۸ درصد در نمونه‌های شیر را نشان داد. برای مواردی، میزان آلودگی در مناطق مرکزی (چهارمحال و بختیاری)، جنوبی (جهرم)، آذربایجان غربی، شمال‌غربی (بناب) و جنوب‌غربی (خوزستان) به ترتیب ۶/۲ درصد، ۱۱ درصد، ۱۶/۹ درصد، ۲۶ درصد و ۱/۱ درصد بوده است. علاوه‌براین، در پژوهش خادمی و همکاران در سال ۲۰۲۰، به‌روش Nested-PCR میزان آلودگی شیر گوسفند و بز به ترتیب ۷/۶ و ۱۶/۶ درصد گزارش شده است (۷, ۹–۱۱).

طبق مطالعات انجام شده در جهان میزان شیوع *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو با روش PCR ۵۶/۶ درصد گزارش شده است (۱۲). در تحقیقی که در کشور ترکیه انجام شد، ۳/۵ درصد از ۴۰۰ نمونه شیر از ۲۳ گله گوسفند برای *کوکسیلا بورنتی* مثبت گزارش شد (۱۳). در بررسیِ دیگری که در سال ۲۰۱۰ در ایالات متحده انجام شد، از ۲۱ نمونه شیر، ۹ نمونه برای *کوکسیلا بورنتی* مثبت گزارش شد (۱۴). همچنین نتایج مشابه‌ای در شیر گوسفند به‌روش Nested-PCR، از ترکیه (۴ درصد)، مجارستان (۴ درصد)، فرانسه (۱۹ درصد) و اسپانیا (۲۲ درصد) گزارش شده است (۱۵).

مهمترین دلایلی که می‌تواند برای تفاوت گزارش‌شده در شیوع *کوکسیلا بورنتی* در محصولات لبنی مناطق مختلف جهانآورد، تنوع در آب و هوا و مناطق جغرافیایی، نحوۀ بررسی، نوع و تعداد نمونۀ مورد مطالعه و فصلی که نمونه گیری انجام شده است (۱۶–۱۹).

طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در سوئد انجام شد از ۳۵۹ نمونه شیر گاو جمع آوری شده از کارخانه‌های تولید پنیر، ۱۷ نمونه (۷/۴ درصد) به *کوکسیلا بورنتی* آلوده بودند (۲۰). مطالعه‌ای که از سال ۲۰۱۳ انجام شد، *کوکسیلا بورنتی* زنده را در محصولات لبنی (پنیر و شیر غیر پاستوریزه) به‌روش Nested-PCR جداسازی کردند (۲۱).

تشخیص ندادن DNA *کوکسیلا بورنتی* در گله‌ها می‌تواند به این دلیل باشد که ارگانیسم برای مدت محدودی پس از زایمان در شیر حیوانات عفونی دفع می‌شود، به عبارت دیگر، PCR منفی بودن نمونه‌ها ممکن است به علت عفونت قبلی با *کوکسیلا بورنتی* بدون دفع ارگانیسم در زمان نمونه گیری باشد. همچنین ممکن است که در زمان نمونه‌گیری از گله‌ها، باکتری در سایر ارگان‌ها غیر از پستان مستقر شده باشد. با این‌حال، ادامۀ پایش این گله‌ها در دراز مدت جهت تشخیص DNA *کوکسیلا بورنتی* مفید است.

با توجه به اینکه شیر مورد بررسی در این پژوهش فقط از گاو گرفته شده، مقایسۀ نتایج این پژوهش با مطالعات دیگران مشکل است:

با توجه به اینکه تعداد نمونه‌های شیر موردآزمایش در این مطالعه به منظور تخمین شیوع عفونت در گله‌های گاو کم است، همین علت ممکن است باعث تخمین بیش‌از حد واقعی شیوع عفونت شود. هدف اصلی فقط جست‌وجوی ژنومی کوکسیلا بورنتی در گله‌های مورد مطالعه بوده، نه شیوع عفونت کوکسیلا بورنتی. با این حال، شیوع عفونت کوکسیلا بورنتی در شیر مخزن به وسیلۀ PCR در سایر کشورها نیز بررسی شده است. در پژوهشی که فرتز و همکاران (۲۰۰۷) در کشور سوئیس و همچنین واندن بروم و همکاران (۲۰۱۲) در هلند روی شیر انجام دادند، مشابه پژوهش رحیمی و همکاران (۲۰۱۰) در استان چهارمحال‌و بختیاری هیچ یک از گله‌های گوسفند در آزمایش PCR مثبت نبودند. هر چند در مطالعه‌ای که در ایالت باسک اسپانیا انجام شد، ۲۲ درصد شیر گله‌های گوسفند در آزمایش PCR مثبت بودند. در مطالعه‌ای دیگر در سوئیس هیچ یک از ۳۹ نمونۀ شیر بزها مثبت نبوده‌اند. در ایران در پژوهش رحیمی و همکاران (۲۰۱۰) در استان چهارمحال‌و بختیاری، فقط یکی از ۵۶ نمونۀ شیر مخزنی ۲۰ گلۀ بز با PCR مثبت بود. با این حال، به‌نظر می‌رسد بزها نسبت به تب کیو

حساس ترند و مخزن مهم تری از *کوکسیلا بورنتی* بوده و می‌توانند نقش بیشتری در انتشار بیماری ایفا کنند. در نهایت با توجه به اینکه در این پژوهش گونه‌های مختلف حیواناتی مطالعه نشده‌اند و نمی‌توان از نظر نوع دام مقایسه انجام داد، ولی مهم این است که DNA کوکسیلا بورنتی در گله‌های مشکوک به تب کیو تشخیص داده شده است (۲۲–۲۵). در پژوهشِ اعتمادفر و همکاران (۲۰۱۷)، از مجموع ۱۲۰ نمونه شیر تانک‌های ذخیرشدهٔ شیر خام گاو و غیر پاستوریزه به روش Nested-PCR، ۹ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر *کوکسیلا بورنتی* مثبت بودند (۲۶).

از دلایل اختلاف بین شیوع *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر در مناطق مختلف، می‌توان به گونه‌های میزبانی، فصل و منطقهٔ جغرافیایی متفاوت، روش انجام آزمایش، نوع و اندازه و روش نمونه‌گیری اشاره کرد. در گله‌های گاو بدون علامت *کوکسیلا بورنتی* منحصراً در شیر دفع می‌شود، این دفع ممکن است برای چندین ماه باقی بماند و ممکن است به‌طور متناوب انجام شود، درنتیجه این امر باعث پایداری ارگانیسم در محیط می‌شود. بنابراین گاوهای به ظاهر سالم مخازن بالقوه‌ای برای انتقال این بیماری در نظر گرفته می‌شود. همچنین فصل‌ها نیز در بروز عفونت کوکسیلا بورنتی در حیوانات تأثیر گذارند؛ به‌طوری که در ژاپن بسیاری از موارد تب کیو در حیوانات در زمستان گزارش شده، از سوی دیگر بیشتر موارد حیوانی در آلمان در فصل تابستان و قبرس فصل پاییز گزارش شده است.

براساس پژوهش انجام شده توسط استین و همکاران (۲۰۱۳)، نمونه‌های شیر بز براساس ژن Com1 غلظت ژنومی *کوکسیلا بورنتی* را بین $۱*۱۰^{۲}$ تا $۱*۱۰^{۶}$ باکتری *کوکسیلا بورنتی* در میلی لیتر تخمین زده شده است. درحالی‌که این غلظت در نمونه‌های شیر گاو براساس ژن *IS1111*، $۱*۱۰^{۱}$ تا $۱*۱۰^{۴}$ تخمین زده شده است. بنابراین یکی از دلایل اختلاف بین میزان آلودگی و شیوع *کوکسیلا بورنتی* می‌توان انتخاب نوع ژن هدف در مطالعات انجام شده و نوع دام یا حیوان مطالعه شده باشد (۲۷).

کوکسیلا بورنتی به دلیل دارا بودن فرم شبه اسپور بسیار مقاوم است(۲۸–۳۰). بنابراین با توجه به اینکه جهت تولید و فرآوری لبنی از شیر مانند پنیرهای سنتی از حرارات و پاستوریزاسیون استفاده نمی‌شود، بنابراین خطرات ناشی از *کوکسیلا بورنتی* برای انسان از طریق مصرف شیر و محصولات شیر غیر پاستوریزه (از جمله پنیر) قابل اغماض نیست.

نتیجه‌گیری

در نهایت نتایج نشان داد که شیر گاو می‌تواند نقش مهمی در اپیدمیولوژی *کوکسیلا بورنتی* (تب کیو) در منطقهٔ استان لرستان داشته باشد. با توجه به اینکه آلودگی شیر گاو تأیید شد، شیر گاو می‌تواند به‌عنوان مهم‌ترین منابع آلودگی برای انسان در منطقهٔ استان لرستان باشد. با توجه به این مسئله نیاز به مطالعات بیشتر و راهکاری جهت بررسی میزان آلودگی در مناطق کشور و کنترل مناسب و پیشگیری به موقع بیماری را بیش از پیش نشان می‌دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از همکارانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنند.

تضاد منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچگونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Sarbazi M, et al., 2015. Effect of pasteurization and packaging on the physicochemical and sensory properties of pot (kope) cheese. *Journal of Food Research*, 507-517.

2. Raoult D,2012. Chronic Q fever: expert opinion versus literature analysis and consensus. *Journal of Infection*, 65(2):102-8.

3. Parisi A, et al.,2006. Diagnosis of Coxiella burnetii-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Veterinary microbiology*,118.1-2: 101-106.

4. Philip CB,1948. Comments on the name of the Q fever organism. *Public Health Reports*,63 (2).

5. Hirai A, et al., 2012 Development of a method for detecting Coxiella burnetii in cheese samples. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2):175-80.

6. Reichel R, et al.,2012.Description of a Coxiella burnetii abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. *Research in veterinary science*,

7. Rozental T, et al.,2020.First molecular detection of Coxiella burnetii in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk

22. Esmaeili S, et al., 2019. Molecular prevalence of Coxiella burnetii in milk in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6):1345-55.
23. Khademi P, et al., 2019. Prevalence of Coxiella burnetii in milk collected from buffalo (water buffalo) and cattle dairy farms in Northwest of Iran. *Comparative Immunology Microbiology Infectiuos Diseases*, 67:101368.
24. Khademi P, et al., 2020. Prevalence of C. burnetii DNA in sheep and goats milk in the northwest of Iran. *International Journal of Food Microbiology*, 108716.
25. Nokhodian Z, et al., 2017. Epidemiology of Q fever in Iran: a systematic review and meta-analysis for estimating serological and molecular prevalence. Journal of research in medical sciences: *the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22.
26. Etemadfar L, et al., 2015. Genomic Detection of Coxiella burnetii in Raw and Unpasteurized Cow Milk of Traditional domestic dairy products Vendors in Khorramabad, Lorestan Province in 2015. *Yafte*,19(2):1-5.
27. Sting R, et al., 2013. Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats. *Veterinary microbiology*, 167(3-4):600-8.
28. Rozental T, et al., 2020. First molecular detection of Coxiella burnetii in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 24(3):208-12.
29. Jaydari A, et al., 2019. Engineering cloning and expression of interleukin 2-Com1 chimera with aim of recominant subunit vaccine production against *Coxiella burnetii*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25:1127-1133.
30. Lorestani S., et al., 2015. Genomic detection of *Coxiella burnetii* in sheep milk samples by Nested-PCR method in Khorramabad, Iran. *Journal of food science and technology (Iran)*, 13(56):165-171
product. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*24:208-12.
8. KHalili M, et al., 2010.Q fever a forgotten disease in Iran. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 17(1):93-7.
9. Rahimi E, et al., 2010. An assay to determine the seasonal prevalence of Coxiella burnetii in cow milk using nested PCR. *Journal of Microbial World*, 3(1):56-62.
10. Khanzadi S, et al., 2014.Identification of Coxiella burnetii by touch-down PCR assay in unpasteurized milk and dairy products in North-East of Iran. *Iranian Jouranlof Veterinary Medicine*, 8:15-9.
11. Khademi P, et al., 2014.Genomic detection of Coxiella burnetii in goat milk samples in animal farms Khorramabad Township, Iran. *Pajoohandeh Journal*, 19(3):162-8.
12. Muskens J, et al., 2011. Prevalence of Coxiella burnetii infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Veterinary Record*, 168(3):79-79.
13. Öngör H, et al., 2004. Detection of Coxiella burnetii by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Veterinary record*, 154(18):570-2.
14. Loftis AD, et al., 2010. Detection of Coxiella burnetii in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne pathogens and disease*, 7(12):1453-6.
15. Cerf O, Condron R, 2006. Coxiella burnetii and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology & Infection*, 134(5):946-51.
16. Kim SG, et al., 2005. Coxiella burnetii in bulk tank milk samples, United States. *Emerging infectious diseases*, 11(4):619.
17. Maurin M, Raoult Df. 1999. Q fever. *Clinical microbiology reviews*,12(4), 518-553.
18. Rahimi E, et al., 2010. An assay to determine the seasonal prevalence of Coxiella burnetii in cow milk using nested PCR.
19. Rodolakis A, et al., 2007. Comparison of Coxiella burnetii shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of dairy science*, 90(12):5352-60.
20. Guatteo R, et al., 2006. Shedding routes of Coxiella burnetii in dairy cows: implications for detection and control. *Veterinary Research*, 37(6):827-33.
22. Eldin C, et al., 2013. Coxiella burnetii DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(4):765-9.